

Зайцева О.В., Жукова Н.В., Жуков В.И.,

Книгавко В.Г., Бондаренко М.А., Гордиенко Н.А.

Харьковский национальный медицинский университет, Харьков, Украина

Люминесцентный анализ в исследовании структурно-функционального состояния плазматических мембран при псориазе

Среди методов исследования мембранной патологии, которая свойственна и псориатической болезни, важная роль принадлежит люминесцентному анализу. Он дает уникальную возможность определить наличие молекулярной патологии на уровне изучения электронных возбужденных состояний молекул, фотохимических реакций, динамики быстрых молекулярных процессов, структуры и свойств химических и биологических систем [1, 2]. Согласно современным представлениям, нарушение физиологических и метаболических процессов в организме тесно связано с формированием мембранной патологии, ведущее значение в которой принадлежит активации свободно-радикального окисления (СРО) и перекисного окисления липидов (ПОЛ) на фоне ингибирования активности антиоксидантной системы (АОС). В соответствии с научными данными [3, 4], люминесцентный анализ при исследовании биологических мембран может оказаться в сотни и тысячи раз чувствительнее спектрофотометрического метода или метода электронного парамагнитного резонанса. **Целью** работы являлось изучение структурно-функционального состояния мембран клеток белой и красной крови у лиц, страдающих псориатической патологией, с использованием люминесцентных методов - биохемилюминесценции, фосфоресценции и флуоресценции.

Материалы и методы исследования. Обследовано 143 больных с распространенной формой псориаза (87 мужчин, 56 женщин) в возрасте от 21 до 67 лет, которые находились на лечении в Областном кожно-венерологическом диспансере г. Харькова. В группу сравнения (контроль) были включены условно здоровые пациенты аналогичного возраста и пола (16 мужчин и 13 женщин). Все больные были разделены на три группы по степени тяжести заболевания и

распространенности патологического процесса: легкая, средняя, тяжелая. Легкая форма течения псориаза клинически установлена у 42 человек (25 мужчин, 17 женщин), средняя - у 87 пациентов (49 мужчин, 38 женщин) и тяжелая - у 14 человек (6 мужчин, 8 женщин). Из всей совокупности больных псориазом (143 пациента) гипертоническая болезнь была выявлена у 38 человек (23 мужчин, 15 женщин). На основании клинико-инструментальных методов, первая стадия гипертонической болезни установлена у 12 мужчин и 8 женщин, вторая стадия обнаружена у 11 мужчин и 7 женщин. В соответствии с программой исследования выделялось три группы наблюдения: I группа - больные псориазом легкой, средней и тяжелой формой; II группа - сочетанная патология псориаза и гипертонической болезни; III группа - условно здоровые пациенты.

Хемилюминесцентный анализ биологических субстратов (цельная кровь и сыворотка) проводили на отечественном стационарном хемилюминометре ХЛМЦ1-01. Определение показателей активности СРО и ПОЛ осуществляли по уровню спонтанной хемилюминесценции (СХЛ), индуцированной (ИХЛ) и люминолзависимой индуцированной хемилюминесценции (ЛЗИХЛ) сыворотки и цельной крови. В качестве индукторов сверхслабого свечения использовались H_2O_2 и хлорное железо ($FeCl_3$) [1].

Исследование флуоресценции сыворотки крови проводилось спектрофлуориметрическим методом следующим образом: на кварцевую пластину размером 5x15 мм наносили 50мкл сыворотки крови и помещали в термостат. При температуре 30°C нанесенные капли высушивались с образованием твердой пленки в течение 20 минут. Кварцевую пластину с высушенной сывороткой помещали в фосфороскоп люминесцентного комплекса и измеряли интенсивность флуоресценции [1].

Для оценки структурно-функционального состояния мембран клеток белой и красной крови изучалась текучесть плазматических мембран лимфоцитов и эритроцитов, для чего рассчитывали коэффициент эксимеризации пирена [3]. Микровязкость оценивалась при этом на основании эксимеризации флуоресцентного зонда. Между степенью эксимеризации пирена и вязкостью

имеется обратная связь, а с текучестью - прямая зависимость. Коэффициент эксимеризации представляет собой отношение количества эксимеров пирена при длине волны испускания $\lambda_{\text{исп}}=470$ нм к количеству его мономеров при длине волны $\lambda_{\text{исп}} = 393$ нм. Эксимеризацию изучали в зоне белок-липидных контактов при длине волны возбуждения $\lambda_{\text{возб}} = 287$ нм и в липидном бислое $\lambda_{\text{возб}} = 334$ нм по методу Ю.А. Владимирова и Е.Г. Добрецова [3], модифицированному для изучения флуоресценции в отдельных клетках с помощью микроскопа ЛЮМАМ-ИЗ.

Результаты исследования обрабатывались методами вариационной статистики с оценкой достоверности различий по t-критерию Стьюдента-Фишера

Результаты исследования и их обсуждение. Изучение свободнорадикальных процессов и ПОЛ выявило повышение интенсивности СХЛ, индуцированной H_2O_2 и хлористым железом, а также люминолзависимой ИХЛ у больных псориазической патологией (табл.1). Результаты исследования обнаружили, что по сравнению с группой условно здоровых у I группы больных интенсивность СХЛ при легкой степени тяжести болезни повышалась на 56%, средней - на 94% и тяжелой - на 141%. Интенсивность индуцированной H_2O_2 хемилюминесценции увеличивалась на 41,9%, 68,6% и 99,5%, соответственно у больных с легкой, средней и тяжелой формой течения заболевания. Сходная динамика наблюдалась и в условиях индукции хемилюминесценции хлористым железом: при легкой степени отмечалось повышение интенсивности на 42%, при средней - на 69,8% и при тяжелой - на 99,3%. Интенсивность люминолзависимой ИХЛ сыворотки крови во всех случаях была повышенной и имела прямую корреляционную связь с тяжестью течения болезни. Так, при ИХЛ- H_2O_2 и ИХЛ- FeCl_3 интенсивность сверхслабого свечения повышалась на 56,9% и 58,6%; 82,9% и 85%; 122% и 125%, соответственно у больных с легкой, средней и тяжелой формой псориазической патологии. Во всех случаях интенсивность индуцированной и люминолзависимой индуцированной хемилюминесценции увеличивалась более, чем в 5 раз, по сравнению с уровнями спонтанной хемилюминесценции. Согласно литературным данным, интенсивность

хемилюминесценции в системе, индуцированной H_2O_2 , отражает образование наиболее реакционно способных радикалов ($\cdot\text{OH}$ -гидроксильного радикала, O_2^- - супероксидного анион радикала кислорода), с которыми взаимодействуют биологические субстраты [2, 3]. Эти радикалы инициируют цепной процесс ПОЛ, протекающий в мембранах, липопротеинах крови и др.

Хемилюминесцентный анализ сыворотки крови во II группе больных с распространенной формой псориаза и сопутствующей гипертонической болезнью обнаружил усиление СХЛ, ИХЛ- H_2O_2 ИХЛ- FeCl_3 и ЛЗИХЛ как при первой, так и при второй стадии гипертонии (табл.1).

Интенсивность СХЛ увеличивалась на 75% и 113%, соответственно, у больных при первой и второй стадии гипертонии болезни. Интенсивность индуцированной H_2O_2 хемилюминесценции повышалась на 47% и 53%. Хлорное железо усиливало ХЛ на 46,2% и 57,8% по сравнению с группой условно здоровых пациентов. При первой и второй стадиях гипертонической болезни интенсивность ЛЗИХЛ- H_2O_2 увеличивалась на 68,2% и 82%; ЛЗИХЛ- FeCl_3 - на 70% и 81%. Следует отметить, что наличие сопутствующей гипертонической болезни у псориатических больных не оказывает существенного влияния на интенсивность свободнорадикальных процессов и ПОЛ, которые в большей мере зависят от степени тяжести псориаза.

Изучение люминолзависимой фосфоресценции (табл.2) свидетельствует о том, что у больных происходят внутримолекулярные перестройки, которые сопряжены с накоплением в сыворотке крови большого количества молекул, находящихся в триплетном возбужденном состоянии, что может обуславливать изменение конформации белковых молекул, присутствующих в сыворотке крови. В ходе исследования фосфоресценции сыворотки крови при длине волны возбуждения $\lambda=297$ нм у больных I группы выявлено повышение интенсивности на 61%, 81% и 97%, соответственно, у пациентов с легкой, средней и тяжелой формой псориатической патологии. При длине волны $\lambda=313$ нм отмечалось усиление фосфоресценции на 19,3%, 28% и 37% у больных с легкой, средней и тяжелой степенью течения болезни. Интенсивности фосфоресценции сыворотки крови

больных и условно здоровых пациентов при длине волны возбуждающего света $\lambda=334$ нм находились практически на одном уровне ($p>0,05$). Воздействие на сыворотку крови возбуждающим светом в области ближнего ультрафиолета $\lambda=365$ нм обнаружило усиление флуоресценции на 44%, 61% и 71% при легкой, средней и тяжелой степени заболевания. При $\lambda=404$ нм интенсивность флуоресценции повышалась на 138%, 171% и 213% в зависимости от степени тяжести патологического процесса. При $\lambda=434$ нм наблюдалось повышение интенсивности на 130%, 157% и 168,5% при легкой, средней и тяжелой степени течения заболевания.

Во II группе больных псориазом с сопутствующей гипертензией при длинах волн 297 нм, 313 нм, 365 нм, 404 нм, 434 нм интенсивность флуоресценции увеличивалась на 65% и 79%; 23% и 31%; 50,9% и 57,9%; 168% и 174%; 117% и 135%, соответственно у пациентов, страдающих первой и второй стадией гипертензии. Появление в длинноволновой области возбуждения увеличенного количества молекул в триплетном состоянии может, по всей видимости, свидетельствовать о разобщении окислительного фосфорилирования и тканевого дыхания. Наличие высоких уровней триплетных возбужденных состояний может указывать на изменение конформации нуклеиновых кислот, белковых молекул и их реакционной способности. Известно, что фотоны ультрафиолетового дальнего спектра поглощаются в основном ароматическими аминокислотами (тирозин-280 нм, триптофан-220 нм, белками 280-300 нм, нуклеиновыми кислотами и нуклеотидами 260 нм) [1]. Это дает нам возможность судить о том, что при псориазе отмечаются структурно-метаболические изменения со стороны крупных полимерных молекул - белков и нуклеиновых кислот. Усиление в длинноволновой области (404 нм, 434 нм) флуоресценции сыворотки крови может отражать повышение уровня содержания гемов (400 нм) как результат активации свободнорадикальных процессов и ПОЛ, что сопряжено с развитием мембранной патологии у больных псориазической болезнью, которая подтверждалась при изучении физико-химических свойств плазматических мембран эритроцитов и лимфоцитов.

Таблица 1

Интенсивность хемилюминесценции сыворотки крови больных с распространенной формой псориаза до лечения и группы условно здоровых пациентов

Группа наблюдения, (n)	Степень тяжести и стадия болезни	Интенсивность хемилюминесценции (J°), $M \pm m$				
		СХЛ	ИХЛ- H_2O_2	ИХЛ- $FeCl_3$	Люминолзависимая ИХЛ	
					ИХЛ- H_2O_2	ИХЛ- $FeCl_3$
I группа: распространенный псориаз (n=143)	Легкая (n=42)	184,7 \pm 15,2*	1022,3 \pm 57,6*	1007,2 \pm 63,4*	1162,4 \pm 47,4*	1154,3 \pm 58,6*
	Средняя (n=87)	230,4 \pm 19,6*	1214,5 \pm 72,3*	1203,6 \pm 57,2*	1354,8 \pm 77,3*	1346,8 \pm 84,5*
	Тяжелая (n=14)	285,3 \pm 25,4*	1437,6 \pm 86,5*	1412,5 \pm 69,3*	1647,5 \pm 82,6*	1642,3 \pm 73,8*
II группа: псориаз и гипертония (n=38)	Первая стадия гипертонии (n=20)	207,4 \pm 16,3*	1064,7 \pm 48,3*	1036,4 \pm 37,5*	1245,6 \pm 35,8*	1237,4 \pm 48,4*
	Вторая стадия гипертонии (n=18)	252,6 \pm 21,3*	1136,4 \pm 52,7*	1117,6 \pm 48,4*	1348,2 \pm 46,3*	1318,6 \pm 54,5*
III группа	Условно Здоровые (n=29)	118,3 \pm 17,6	720,3 \pm 46,2	708,6 \pm 37,9	740,4 \pm 41,3	727,6 \pm 45,3

Примечание: * - различия достоверны с группой «условно здоровые», $p < 0,05$

Таблица 2

Интенсивность люминолзависимой флуоресценции сыворотки крови больных с распространенной формой псориаза до лечения и группы условно здоровых пациентов

Группа наблюдения, (n)	Степень тяжести и стадия болезни	Интенсивность флуоресценции (J°),					
		$\lambda=297\text{нм}$	$\lambda=313\text{нм}$	$\lambda=334\text{нм}$	$\lambda=365\text{нм}$	$\lambda=404\text{нм}$	$\lambda=434\text{нм}$
I группа: распространенный псориаз (n=143)	Легкая (n=42)	5024,3±243,8*	382,5±43,7	605,4±49,2	2503,6±124,7*	1150,3±58,9*	1407,8±62,4*
	Средняя (n=87)	5635,6±187,9*	410,3±38,9*	620,7±54,3	2804,2±136,5*	1308,7±73,4*	1573,6±47,5*
	Тяжелая (n=14)	6127,4±252,3*	440,7±53,6*	705,3±46,8	2976,8±147,3*	1510,4±67,2*	1688,7±54,3*
II группа: псориаз и гипертония (n=38)	Первая стадия гипертонии (n=20)	5137,6±174,2*	395,7±48,3	623,2±37,5	2623,4±118,6*	1294,2±63,7*	1325,4±42,9*
	Вторая стадия гипертонии (n=18)	5583,2±149,6*	420,3±51,8*	630,4±48,3	2746,8±124,3*	1325,6±68,8*	1437,8±50,6*
III* группа	Условно здоровые (n=29)	3107,4±129,8	320,6±21,5	650,7±35,9 .1	1738,4±68,4	482,6±43,7	610,4±35,2

Примечание: - * различия достоверны с группой «условно здоровые», $p<0,05$

У всех больных псориазом и с сопутствующей гипертонической патологией наблюдалось нарушение текучести, вязкости и заряда плазматических мембран (табл.3). Этому процессу в большей степени были подвержены мембраны эритроцитов, в которых значительные изменения определены в липидном бислое и в зоне белок-липидных контактов. В зависимости от степени тяжести заболевания наблюдалось снижение текучести мембран и увеличение их вязкости. В лимфоцитах снижение текучести мембран затрагивало преимущественно липидный бислой и было максимальным при тяжелой степени течения псориаза и минимальным при легкой форме болезни. Так, исследования текучести плазматических мембран лимфоцитов показали снижение коэффициента эксимеризации пирена у I группы наблюдения в зоне белок-липидных контактов и липидного бислоя на 33,7% и 37%; 44,8% и 46,5%; 55,2% и 57,6%, соответственно при легком, среднем и тяжелом течении заболевания псориазом. В эритроцитах текучесть мембран еще более снижалась. Коэффициент эксимеризации в области белок-липидных контактов и липидном бислое снижался на 39% и 22,1%; 50,8% и 52, 58,9% и 60%, соответственно при легкой, средней и тяжелой степени заболевания. Существенные изменения текучести плазматических мембран в эритроцитах могут быть связаны с низким уровнем репаративных процессов в этих безъядерных клетках по сравнению с лимфоцитами. Во II группе больных с сопутствующей гипертонической болезнью текучесть плазматических мембран лимфоцитов в зоне белок-липидных контактов и липидном бислое снижалась на 35,4% и 28,5% при первой стадии и на 41,2% и 51,1% при второй стадии гипертонии. В эритроцитах эти показатели еще более снижались и составляли 37% и 37,5% при первой стадии и 54,1% и 52,5% при второй по сравнению с группой условно здоровых пациентов, что свидетельствовало о повышении вязкости плазматических мембран. Установленные нарушения структурно-функционального состояния мембран можно экстраполировать на активность мембраносвязанных ферментов, выполняющих важную транспортную функцию субстратов обмена, ионов металлов, что является прогностически значимым показателем изменения внутриклеточного метаболизма у больных псориазической

Таблица 3

Состояние плазматических мембран клеток крови у больных распространенным псориазом

Группа наблюдения	Степень тяжести и стадия болезни	Текучесть плазматических мембран (коэффициент эксимеризации $\lambda_{исп}=470\text{нм}/\lambda_{исп}=393\text{нм}$), $M \pm m$			
		лимфоциты		эритроциты	
		Белок-липидные контакты	Липидный бислой	Белок-липидные контакты	Липидный бислой
I группа: распространенный псориаз (n=143)	Легкая (n=42)	2,47±0,09*	2,32±0,08*	2,18±0,04*	2,23±0,08*
	Средняя (n=87)	2,12±0,08*	1,97±0,12*	1,76±0,06*	1,56±0,05*
	Тяжелая (n=14)	1,72±0,06*	1,56±0,04*	1,47±0,03*	1,32±0,04*
II группа: псориаз и гипертония (n=38)	Первая стадия гипертонии (n=20)	2,48±0,07*	2,63±0,05*	2,25±0,17*	2,05±0,07*
	Вторая стадия гипертонии (n=18)	2,26±0,09*	1,17±0,08*	1,64±0,13*	1,56±0,06*
III группа	Условно здоровые (n=29)	3,84±0,14	3,68±0,12	3,57±0,07	3,28±0,05

Примечание: * - различия достоверны по сравнению с группой «условно здоровые», $p < 0,05$

патологией. Исследование интенсивности флуоресценции зонда 1-анилино-8-нафталин-сульфата (1,8АНС) в лимфоцитах и эритроцитах, отражающей изменение поверхностного заряда плазматических мембран, выявило существенное ее снижение у больных псориазом и при сочетанной патологии.

Выводы. Таким образом, результаты исследования свидетельствуют, что ведущим патогенетическим фактором развития псориаза является активация свободнорадикальных процессов и перекисного окисления липидов, которые формируют в организме мембранную патологию, при которой отмечаются глубокие нарушения белкового и нуклеинового обмена. Основными показателями нарушения физико-химического состояния плазматических мембран были текучесть, вязкость, изменение заряда, гидрофобного объема и полярности как у больных псориазом, так и при сопутствующей гипертонической болезни, которые коррелировали со степенью тяжести течения псориазической болезни.

Список литературы

1. Устройство для регистрации при комнатной температуре люминесценции биологических мембран / Абашин В.М., Сергиенко Н.Г., Жуков В.И. и др.// Патент № 4946578/25 UA Российской Федерации. Бюл. №8 опубл. – 20.03.95.
2. Барабой В.А., Сутковой Д.А. Окислительно-антиоксидантный гомеостаз в норме и патологии.- К: Чернобыльинтеринформ, 1997. - Часть 1. -205с.
3. Владимиров Ю.А., Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. - Москва: Наука, 1980.- 320с.
4. Жуков В.И., Зайцева О.В., Золотаревская Л.А. и др. Структурно-функциональная теория биологического действия радиотоксинов. - Харьков: Основа, 1998. – 225с.